

1/5/1

DIALOG(R) File 351:Derwent WPI
(c) 2003 Thomson Derwent. All rts. reserv.

009787422
WPI Acc No: 1994-067275/199409

XRAM Acc No: C94-030133

XRXPX Acc No: N94-052661

Isolation of circulating cancer cells from bloodstream - by apheresis, to establish individual-specific cell lines and produce antibodies for therapy and diagnosis

Patent Assignee: KUEBLER GMBH (KUEB-N); KUEBLER GMBH ULRICH (KUEB-N)

Inventor: HOFFMANN R; KUEBLER U; HOFFMAN R

Number of Countries: 019 Number of Patents: 012

Patent Family:

Patent No	Kind	Date	Applicat No	Kind	Date	Week	
EP 584715	A2	19940302	EP 93113227	A	19930818	199409	B
DE 4228389	A1	19940303	DE 4228389	A	19920826	199410	
DE 4244715	A1	19940428	DE 4228389	A	19920826	199418	
			DE 4244715	A	19920826		
DE 4228389	C2	19940721	DE 4228389	A	19920826	199427	
JP 6205671	A	19940726	JP 93211352	A	19930826	199434	
DE 4244715	C2	19950614	DE 4228389	A	19920826	199528	
			DE 4244715	A	19920826		
EP 584715	A3	19950222	EP 93113227	A	19930818	199541	
US 5529903	A	19960625	US 93111520	A	19930825	199631	
EP 584715	B1	19981223	EP 93113227	A	19930818	199904	
DE 59309239	G	19990204	DE 509239	A	19930818	199911	
			EP 93113227	A	19930818		
ES 2126618	T3	19990401	EP 93113227	A	19930818	199920	
DE 9321535	U1	19990805	DE 93U21535	U	19930818	199937	
			EP 93113227	A	19930818		

Priority Applications (No Type Date): DE 4228389 A 19920826; DE 4244715 A 19920826

Cited Patents: -SR.Pub; 7.Jnl.Ref; US 5112298; DWO 8905657; AWO 8907445

Patent Details:

Patent No	Kind	Lan Pg	Main IPC	Filing Notes
-----------	------	--------	----------	--------------

EP 584715	A2	G	12 C12N-005/08	
-----------	----	---	----------------	--

Designated States (Regional): AT BE CH DE DK ES FR GB GR IE IT LI LU MC
NL PT SE

DE 4228389	A1	8	C12N-005/10	Div ex application DE 4228389
DE 4244715	A1	8	C07K-015/28	Div ex patent DE 4228389

DE 4228389	C2	8	C12N-005/02	
JP 6205671	A	10	C12N-005/08	
DE 4244715	C2	8	C07K-016/00	Div ex application DE 4228389
				Div ex patent DE 4228389

US 5529903	A	8	G01N-033/574	
EP 584715	B1	G	C12N-005/08	

Designated States (Regional): AT BE CH DE DK ES FR GB GR IE IT LI LU MC
NL PT SE

DE 59309239	G		C12N-005/08	Based on patent EP 584715
ES 2126618	T3		C12N-005/08	Based on patent EP 584715
DE 9321535	U1		C12N-005/02	application EP 93113227
EP 584715	A3		C12N-005/08	

Abstract (Basic): EP 584715 A

Method (A) for isolating and culturing transformed cells
circulating in the bloodstream of an individual comprises treating



blood from the individual in an apheresis device to obtain a cell fraction which is enriched with the transformed cells and opt. also contains leukocytes and/or lymphocytes, and culturing the transformed cells.

Also claimed is a method (B) for producing individual-specific antibodies directed against tumour antigens, comprising using transformed cells isolated by method (A) to stimulate B-lymphocytes into producing antibodies against tumour antigens on the transformed cells; immortalising, multiplying and selecting the stimulated B-lymphocytes; and isolating and purifying the antibodies produced by culturing the immortalised B-lymphocytes.

Also claimed are: (1) individual-specific transformed-cell lines obtainable by method (A); (2) individual specific hybridoma cell lines obtainable by method (B); and (3) individual-specific poly- or mono-clonal antibodies directed against tumour antigens, obtainable by method (B).

USE - Method (A) is useful for isolating metastasing cancer cells, esp. mammary carcinoma, B-cell lymphoma, renal adenocarcinoma, bronchial carcinoma, prostatic carcinoma or melanoma cells. The antibodies, opt. modified by coupling to immunotoxins and/or detectable labels, are useful for individual-specific therapy and/or diagnosis of cancer.

Dwg.0/0

Title Terms: ISOLATE; CIRCULATE; CANCER; CELL; BLOOD; ESTABLISH; INDIVIDUAL ; SPECIFIC; CELL; LINE; PRODUCE; ANTIBODY; THERAPEUTIC; DIAGNOSE

Derwent Class: B04; D16; P31; S03

International Patent Class (Main): C07K-015/28; C07K-016/00; C12N-005/02; C12N-005/08; C12N-005/10; G01N-033/574

International Patent Class (Additional): A61B-010/00; A61K-039/395; B01D-021/26; C12N-005/12; C12N-005/20; C12N-005/24; C12P-021/08; G01N-033/483; G01N-033/50; G01N-033/53; C12R-001-91

File Segment: CPI; EPI; EngPI

⑯ BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENTAMT

⑯ Patentschrift
⑯ DE 42 28 389 C 2

⑯ Int. Cl. 5:
C 12 N 5/02
C 12 N 5/12
A 61 K 39/395
G 01 N 33/53

Innerhalb von 3 Monaten nach Veröffentlichung der Erteilung kann Einspruch erhoben werden

⑰ Patentinhaber:
Dr. Kübler GmbH, 80538 München, DE

⑰ Vertreter:
Eitle, W., Dipl.-Ing.; Hoffmann, K., Dipl.-Ing.
Dr.rer.nat.; Lehn, W., Dipl.-Ing.; Füchsle, K.,
Dipl.-Ing.; Hansen, B., Dipl.-Chem. Dr.rer.nat.;
Brauns, H., Dipl.-Chem. Dr.rer.nat.; Görg, K.,
Dipl.-Ing.; Kohlmann, K., Dipl.-Ing.; Ritter und Edler
von Fischern, B., Dipl.-Ing.; Kolb, H., Dipl.-Chem.
Dr.rer.nat., Pat.-Anwälte; Nette, A., Rechtsanw.,
81925 München

⑰ Erfinder:
Kübler, Ulrich, Dr., 81545 München, DE; Hoffmann,
Rainer, Dipl.-Biol., 82256 Fürstenfeldbruck, DE

⑯ Für die Beurteilung der Patentfähigkeit
in Betracht gezogene Druckschriften:
NICHTS ERMITTELT

⑯ Gewinnung und Kultivierung transformierter Zellen

DE 42 28 389 C 2

DE 42 28 389 C 2

Beschreibung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Gewinnung transformierter Zellen aus dem Blutstrom eines menschlichen oder tierischen Individuum und ein Verfahren zur Kultivierung der so gewonnenen Zellen.

Über die Bedeutung von im Blutstrom zirkulierenden transformierten Zellen für die Ausbildung von Metastasen berichtet A. J. Salsbury in "Significance of Circulating Cancer Cells", William Heinemann Medical Books, New Aspects of Breast Cancer, Bd. 3, S. 245ff, 1977, daß diese im Blutstrom zirkulierenden Krebszellen in einem Zeitraum bis zu 5–6 Stunden nach ihrer Freisetzung – z. B. durch bestimmte operative und therapeutische Maßnahmen – noch keine Metastasen ausbilden können. Das Vorhandensein großer Mengen an Krebszellen allein genügt noch nicht für das Auftreten von Metastasen, die Krebszellen müssen zuerst den vaskulären Bereich verlassen. Dennoch wird die Verwendung von Mitteln vorgeschlagen, die einerseits die Ausbildung von Thromben als Ausgangspunkte für die Metastasenbildung aus dem Blutstrom verhindern und andererseits die malignen Zellen abtöten sollen.

Neuere Erkenntnisse (P. M. Gullino, Dev. Oncol., 49, 251–271 (1986)) legen jedoch nahe, daß zirkulierende Tumorzellen in den meisten Fällen bereits lange bevor der Primärtumor klinisch nachgewiesen werden kann, im Blutstrom auftreten. Auch wenn nicht alle dieser transformierten Zellen zur Auslösung von Metastasen in der Lage sind, ist es erforderlich, die Ausbreitung von zirkulierenden Tumorzellen und damit das Metastasenwachstum so früh wie möglich zu bekämpfen. Der Grund, warum bislang noch keine eindeutige Korrelation zwischen der Anzahl transformierter Zellen im peripheren Blut und der Auslösung der Metastasenbildung aufgestellt werden konnte, liegt zu einem großen Teil in der Schwierigkeit des Nachweises der transformierten Zellen im Blutstrom.

Ferner ist bekannt, daß schon bei üblichen Diagnoseverfahren, wie Abtasten des soliden Tumors, und insbesondere bei biotischen und operativen Eingriffen die Freisetzung transformierter Tumorzellen deutlich erhöht wird, was zu einer verstärkten Metastasenbildung führen kann.

Das Metastasierungs-Verhalten von soliden Tumoren in das Lymph- und/oder Kreislauf-System hinein ist bisher in vivo nur in eröffneten Blutgefäßen bei Operationen studiert worden. Zirkulierende Tumorzellen in diagnostisch oder gar therapeutisch verwertbarem Umfang wurden dabei nicht gewonnen. Das Metastasierungs-Verhalten von soliden Tumoren in den Kreislauf ließ sich daher nur in Tiersuchen oder beim Menschen nur postmortale durch den Pathologen untersuchen.

Transformierte Zellen lassen sich prinzipiell mit einer Dichtegradienten-Zentrifugation, wie sie z. B. üblicherweise zur Isolierung von Lymphozyten in einem Ficollgradienten eingesetzt wird, gewinnen. Hierfür sind jedoch große Blutmengen ab 1500 ml Blut erforderlich, was für den Patienten sehr belastend ist. Ferner ist auch trotz eines hohen apparativen Aufwands die Ausbeute aufgrund der geringen Anzahl transformierter Zellen, die zudem durch das konventionelle Zentrifugationsverfahren leicht beschädigt und verunreinigt werden, äußerst niedrig. Daher ist ein Dichtegradienten-Zentrifugationsverfahren routinemäßig zur Gewinnung größerer Mengen von transformierten Zellen nicht einsetzbar. Die bekannten Methoden zeigen auch insbesondere

den Mangel, daß man nicht feststellen konnte, ob eine transformierte Zelle aus dem peripheren Kreislauf zum Zeitpunkt ihrer Gewinnung vital war oder nicht.

Es existiert somit bislang kein einfach durchzuführendes und reproduzierbares Verfahren, das es erlaubte, auf nicht chirurgische Weise eventuell im peripheren Kreislauf zirkulierende transformierte metastasierte Zellen zu erkennen, zu gewinnen, diese außerhalb des Körpers zu kultivieren und für Untersuchungen und andere Anwendungen weiter einzusetzen.

Der Erfindung liegt daher die Aufgabe zugrunde, ein Verfahren zur Verfügung zu stellen, mit dem es auf einfache und ungefährliche Weise möglich ist, aus einem menschlichen oder tierischen Individuum im Blutstrom zirkulierende transformierte Zellen zu gewinnen.

Damit verbunden ist die Aufgabe, die so gewonnenen Zellen in Kultur zu vermehren und gegen Antigene auf ihrer Oberfläche gerichtete monoklonale Antikörper herzustellen, die dann für diagnostische und/oder therapeutische Zwecke eingesetzt werden können.

Die Erfindung beruht auf der Erkenntnis, daß es möglich ist, transformierte Zellen durch ein kontinuierliches Zentrifugationsverfahren von Blut zu gewinnen.

Die Aufgabe wird somit gelöst durch ein Verfahren zur Gewinnung und Kultivierung von im Blutstrom zirkulierenden transformierten Zellen, indem man durch Zentrifugation von einem Individuum entnommenen Blut mittels einer für die Abtrennung von Lymphozyten geeigneten, kontinuierlichen Zentrifuge einen Buffy-coat, der die transformierten Zellen, Leukozyten und Lymphozyten enthält, über einen der Zentrifuge nachgeschalteten Bypass entnimmt und den Buffy-coat unter Vermehrung der transformierten Zellen kultiviert.

Das erfundungsgemäße Verfahren erlaubt die Bereitstellung von in Kultur vermehrten, transformierten Zellen, die zur Herstellung von individuum-spezifischen, gegen Tumorantigene gerichteten monoklonalen Antikörpern verwendet werden können.

Zur Herstellung dieser Antikörper bringt man in einer *in vitro*-Immunisierung aus demselben Individuum isolierte B-Lymphozyten mit den kultivierten transformierten Zellen in Kontakt, um die Produktion von gegen Tumorantigene auf den transformierten Zellen gerichteten Antikörpern zu stimulieren, immortalisiert, vermehrt und selektiert die stimulierten B-Lymphozyten, und isoliert und reinigt die Antikörper aus der immortalisierten B-Lymphozytenkultur.

Der Organismus wäre prinzipiell in der Lage, das "Arzneimittel", d. h. die Antikörper, mit seinem Immunsystem selbst herzustellen. Die Zahl der im Blutstrom zirkulierenden transformierten Zellen, und damit die Zahl der entsprechenden Antigene, ist jedoch gerade im für die Diagnostik und Therapie wichtigen Frühstadium im allgemeinen viel zu gering, um eine ausreichende Immunantwort auslösen zu können. Dieses Verfahren erlaubt dagegen die Bereitstellung einer großen Menge an tumorspezifischen Antigenen in Form einer Kultur der transformierten Zellen, die sich beliebig vermehren läßt.

Bisher war man der Annahme, daß die an sich bekannten Zentrifugationsverfahren nur für die im Kreislauf ohnehin ständig peripher zirkulierenden weißen Blutkörperchen geeignet seien. Die Erfinder haben nun überraschenderweise festgestellt, daß sich unter diesen Milliarden von Lymphozyten und Leukozyten bei an Krebs erkrankten Patienten auch abgesiedelte transformierte Zellen des Primärtumors befinden.

Für das vorliegende Verfahren ist jede kontinuierli-

che Zentrifuge einsetzbar, die üblicherweise auch zur Lymphozytentrennung vom Blutplasma und von den Erythrozyten und anderen Bestandteilen des Blutes ohne chemischen Dichtegradienten und anschließender Anreicherung verwendet wird.

Solche Zentrifugen wurden bislang z. B. in einem Verfahren zur Verminderung der Lymphozytenpopulation bei Patienten mit Lymphozytenleukämie in Kombination mit einem extracorporalen Bestrahlungsverfahren eingesetzt (EP-A 30358). Hierzu wird dem Patienten Blut entnommen und dieses in Gegenwart einer lichtreaktiven chemischen Verbindung, wie z. B. einem Psoralenderivat, das zuvor oral verabreicht wurde oder nach der Entnahme dem Blut zugegeben wurde, mit UV-Licht bestrahlt. Das Psoralen interkaliert mit der DNA der Zellen und vermag nach Lichtaktivierung mit der DNA zu reagieren und dabei Onkogene auszuschalten. Anschließend führt man das bestrahlte Blut dem Patienten wieder zu.

Durch das erfindungsgemäße Verfahren der kontinuierlichen Zentrifugation werden nur ca. 100 bis 200 ml Blut, entsprechend dem Füllungsvolumen der kontinuierlichen Zentrifuge benötigt. Ferner ist es möglich, nur die Leukozyten, Lymphozyten und die in dieser Fraktion enthaltenen transformierten Zellen schonend aus dem Blut abzutrennen, die übrigen Blutbestandteile werden dem Patienten wieder zurückgegeben. Bevorzugt geschieht dies in einem Arbeitsgang. Auf diese Weise wird die Belastung des Patienten so gering wie möglich gehalten, andererseits gelingt es, in kurzer Zeit ausreichende Mengen an transformierten Krebszellen zu isolieren, die dann entsprechend weiterverarbeitet werden können.

Vor der Blutzuführung wird die Zentrifuge mit einer pharmazeutisch annehmbaren, isotonischen Lösung gefüllt, die mit einem gerinnungshemmenden Mittel, z. B. Heparin, versetzt ist, üblicherweise reichen hierfür 1000 bis 2000 Einheiten aus. Für die Separation von transformierten Zellen aus dem Blutstrom werden über einen geeigneten, am Zentrifugenausgang angebrachten Bypass-Mechanismus beliebig viele weiße Blutkörperchen mit darunter vermischt transformierten Zellen entnommen, wobei der Fachmann ohne weiteres in der Lage ist, die Leukozytenfraktion zu identifizieren:

Bei Erscheinen einer weißen Bande, die sich deutlich von den roten Erythrozyten abhebt, wird der Bypass der Zentrifuge geöffnet und ca. 40 ml der weißen Blutkörperchen bei einer Zentrifuge mit einem Fassungsvermögen von 120 ml entnommen. Die roten Blutkörperchen, das Plasma und die anderen Blutbestandteile werden dem Körper wieder zurückgegeben.

Für das erfindungsgemäße Verfahren besonders geeignet ist eine kontinuierliche Zentrifuge aus einem durchsichtigen Material und einem Fassungsvermögen von 100—150 ml, welche es erlaubt, nach Füllung mit dem erwünschten Volumen an Blut dieses in ca. 10 min bei einer Umdrehungszahl von 3600 bis 3800 Upm in die Hauptbestandteile aufzutrennen. Im übrigen wird für die Isolierung der Zellen entsprechend den Herstellerangaben verfahren. Das Zellsortierung zur Gewinnung maligner Zellen kann beliebig oft, unabhängig von einer Operation, vor oder nach dieser, erfolgen. Die einzige Voraussetzung zur Gewinnung maligner Zellen ist das Vorhandensein dieser im Kreislauf.

Die Leukozytenfraktion mit den darin enthaltenen Leukozyten, Lymphozyten und transformierten Zellen, die sogenannte "Buffy-coat", wird in eine Kulturlösung überführt. Zur Kultur der transformierten Zellen kann

jedes Basiszellkulturmedium eingesetzt werden, welches eine Kohlenstoff- und Stickstoffquelle sowie weitere notwendige anorganische und organische Bestandteile, wie Vitamine, Aminosäuren und Spurenelemente enthält. Bevorzugt sind handelsübliche Medien, wie z. B. RPMI 1640-M dium, ggf. mit einem Supplement wie fötalem Kälberserum ergänzt. Die Kulturbedingungen werden nach den Herstellerangaben eingestellt, üblicherweise werden Standardbedingungen von 5% CO₂, 37°C und 95% Luftfeuchtigkeit verwendet.

Die Zugabe von Macrophagen-Inhibierendem-Peptid verhindert, daß die wenigen transformierten Zellen im großen Überschuß von Lymphozyten durch Macrophagen zerstört werden. Dagegen hemmt der Zusatz von B- und T-zellspezifischen Antikörpern (CD 8-, CD-25-, Interleukin- und Interferon-spezifische Antikörper) die Vermehrung der Lymphozyten, die schließlich sterben. Über bekannte Zellsortierung-Verfahren können alternativ die Leukozyten, Lymphozyten und andere störende Zellen aus dem Buffy-coat abgetrennt werden. Die Ansätze werden auf Microtiterplatten verteilt, und schon nach ca. vier Tagen sind die Klone der transformierten Zellen gut sichtbar. Die transformierten Zellen lassen sich aufgrund ihrer Morphologie eindeutig von eventuell noch vorhandenen Lymphozyten unterscheiden und ähneln sehr stark den Primärtumorzellen. Nach ca. einer Woche stehen bereits genug transformierte Zellen für die anschließende in vitro-Immunisierung zur Verfügung. Für eine Verwendung zu einem späteren Zeitpunkt können die Klone auch eingefroren werden.

Die Krebszellen können dem Körper in modifizierter nicht-pathogener Form als Immunogen wieder zugeführt werden. Hierfür können z. B. isolierte Membranfraktionen, die noch die Tumorantigene tragen, verwendet werden. Es besteht auch die Möglichkeit, mit diesen Antigenen einen anderen Fremdorganismus, z. B. Maus, Kaninchen oder Ziege, zu immunisieren und hieraus nach üblichen Methoden polyklonale oder monoklonale Antikörper zu gewinnen, die dann zur Diagnostik oder Therapie verwendet werden können.

So können die kultivierten Krebszellen vorteilhaft dazu benutzt werden, aus demselben Organismus isolierte B-Lymphozyten in einer in vitro-Immunisierung, d. h. außerhalb des Körpers, zu stimulieren und aus den so stimulierten B-Lymphozyten Hybridoma-Zellklone herzustellen, die zur permanenten Sekretion monoklonaler Antikörper in der Lage sind. Neben der Hybridomatechnik ist auch die Immortalisierung der B-Lymphozyten mit Epstein-Barr-Viren möglich. Die Erfindung bildet somit das körpereigene Immunsystem in technisch kontrollierbarer Weise nach.

Die in Kultur vermehrten malignen Zellen werden zu einem gegebenen Zeitpunkt, jedoch vorzugsweise möglichst früh nach der Entnahme, d. h. nach ca. 8 bis 10 Tagen, mit körpereigenen B-Lymphozyten des Patienten in Kontakt gebracht. Nachdem für die Isolierung der B-Lymphozyten nur etwa 50 ml Blut notwendig sind und die B-Zellen in einem großen Überschuß im Gegensatz zu den transformierten Zellen vorhanden sind, können diese auch durch Zentrifugation in einem Dichtegradienten, z. B. einem Ficollgradienten, erfolgen. Die Entnahme der B-Lymphozyten erfolgt jedoch bevorzugt ebenso mit der kontinuierlichen Zentrifuge. Bevorzugt werden die Verfahrensschritte der Anlegung der Krebszellenkultur und die Isolierung der B-Zellen so aufeinander abgestimmt, daß eine in vitro-Immunisierung zu einem möglichst frühen Zeitpunkt nach der Zellentnahme, d. h. nach ca. 8 bis 10 Tagen, erfolgen kann.

Für die in vitro-Immunisierung kann der gesamte Buffy-coat verwendet werden (T- und B-Lymphozyten), da nur die stimulierten B-Lymphozyten die Antikörper sezernieren, wobei der Buffy-coat und die transformierten Zellen in einem Verhältnis bezogen auf die Anzahl der Zellen bevorzugt von 100 : 1 bis 1 : 1 und besonders bevorzugt im Verhältnis von ca. 10 : 1 eingesetzt werden. Durch Zugabe von Interleukinen wie IL-2, IL-4, IL-5, IL-6 und gamma-Interferon wird die Stimulierung der antikörpervollen Zellen begünstigt. Die Konzentration dieser Hilfsstoffe im Immunisierungsansatz beträgt jeweils 0,1 bis 10 mM, bevorzugt ca. 1 mM.

Zur unbegrenzten Vermehrung müssen die stimulierten B-Lymphozyten immortalisiert werden. Dies kann bevorzugt durch Transformation der B-Lymphozyten mit Epstein-Barr-Viren analog dem Verfahren wie in der deutschen Patentschrift DE 39 28 769 C2 beschrieben. Besonders bevorzugt zur Produktion großer Antikörpermengen ist die Herstellung einer Hybridomakultur. Für die Fusion mit den B-Zellen werden je nach Spenderorganismus speziespezifische Myelomazellen verwendet. Beim Menschen hat sich die Myelomazelllinie U-266 für diesen Zweck besonders bewährt. Die B-Zellen werden mit den Myelomazellen in dem optimalen Verhältnis von 1 : 1 vereinigt. Zur Unterstützung der Zellfusion können Hilfsstoffe wie Polyethylenglycol zugesetzt werden. Anschließend wird der Ansatz zur Selektion auf Hybridomaklone auf Microtiterplatten ausgesät und der Kulturrüberstand nach Antikörpern getestet. Die Kulturbedingungen sind wie für Hybridomakulturen üblich.

Durch Epitop-Screening werden Hybridomaklone selektiert, die verschiedene antigene Determinanten auf der Oberfläche der transformierten Zelle erkennen, und die Spezifität der Antikörper verifiziert. Die auf diese Weise erhaltenen Hybridomazelllinien können zur Gewinnung von monoklonalen Antikörpern weiter vermehrt und/oder für eine spätere Verwendung eingefroren werden.

Die Antikörper werden nach konventionellen Verfahren aus dem Kulturrüberstand isoliert und mit üblichen Proteinreinigungs-Methoden, wie Ammoniumsulfatfällung, Gelchromatographie, Ionenaustausch-Chromatographie, Affinitätschromatographie und/oder FPLC und elektrophoretischen Verfahren möglichst bis zur Homogenität gereinigt.

Die extracorporeale in vitro-Immunisierung erfolgt ohne Passagen in Fremdorganismen und liefert große Mengen an Antikörpern, die für den speziellen Tumor aus dem Spenderindividuum spezifisch und somit zur Verwendung für seine Diagnose und seine Bekämpfung in diesem speziellen Individuum optimal geeignet sind. Andererseits stammen die Antikörper aus B-Lymphozyten, die ebenfalls demselben Individuum entnommen wurden. Die erfundungsgemäßen Antikörper sind daher, obgleich außerhalb des Körpers hergestellt, "körpereigene" Proteine, die nach Applizierung im Organismus keine gegen sie gerichtete Immunantwort auslösen, was sonst zu ihrem raschen Abbau und damit zu einer verringernten therapeutischen Wirksamkeit führen könnte.

Die nach diesem Verfahren hergestellten Antikörper umfassen alle Subklassen wie IgG, IgM und IgE, bevorzugt sind Antikörper vom IgG-Typ. Die Antikörper können ferner chemisch oder enzymatisch modifiziert werden, solange ihre physiologische Aktivität, d. h. Erkennung und Bindung an die krebszellen-spezifische antigene Determinante, erhalten bleibt.

An die Antikörper können nach dem konventionellen

Glutaraldehyd-Verfahren Immuntoxine, wie z. B. Ricin oder Diphtherie-Toxin gekoppelt werden. Ferner können die Antikörper mit radioaktiven Substanzen, z. B. ¹²⁵I oder Markerenzymen für einen RIA oder ELISA markiert werden.

Die Antikörper können ohne weitere Modifikationen zur Herstellung eines Arzneimittels verwendet werden, wobei in einer pharmazeutischen Zusammensetzung eine oder mehrere monoklonale Antikörperarten, die jeweils gegen ein bestimmtes Epitop gerichtet sind, enthalten sein können.

Nach Verabreichung an einen Patienten sind sie in der Lage, an abgesiedelte Tumorzellen zu binden und auf diese Weise Macrophagen oder körpereigene Killerzellen anzulocken, die dann ihrerseits die Krebszellen zerstören.

Die Antikörper werden in einer pharmazeutisch annehmbaren Formulierung zusammen mit hierfür üblichen Trägern, Verdünnern, Stabilisatoren und gegebenenfalls weiteren Hilfsstoffen dem Patienten verabreicht. Das Arzneimittel kann in jeder geeigneten Formulierung, bevorzugt in Form einer intravenösen, intramuskulär oder subkutan injizierbaren Lösung vorliegen. Besonders bevorzugt werden die Antikörper nach ihrer Gewinnung lyophilisiert und in einer Einheitsdosis in Ampullen gefüllt und versiegelt. Kurz vor der Verwendung werden Antikörper mit einer für die Injektion geeigneten Trägerlösung gelöst oder suspendiert. Die Trägerlösung, üblicherweise eine sterile, gepufferte wäßrige Lösung, kann in einer eigenen Ampulle zusammen mit den lyophilisierten Antikörpern in einer Arzneimittelpackung beigegeben sein. Der behandelnde Arzt wird hierbei je nach Alter und Zustand des Patienten, nach Art des Tumors und Schwere der Erkrankung eine geeignete Dosierung und Verabreichungsform wählen.

Für die Herstellung eines Arzneimittels zur Tumorbehandlung kann auch bevorzugt die Eigenschaft eines Antikörpers ausgenutzt werden, hochspezifisch sein entsprechendes Antigen zu erkennen und daran zu binden. Ein Wirkstoff, der mit dem Antikörper in geeigneter Weise, d. h. nicht über den für die Antigenerkennung wichtigen Bereich, kovalent verbunden ist, lässt sich somit via Antikörper als Transportvehikel direkt an den gewünschten Wirkort transportieren, um nur dort und nicht unspezifisch im Organismus verteilt seine Wirkung zu entfalten. Durch Ankoppelung von Immunoxytoxinen, z. B. Ricin, oder Radiotherapeutika an diese monoklonalen Antikörper nach an sich bekannten Verfahren können somit die Tumorzellen zerstört werden.

Durch Verabreichung dieser monoklonalen modifizierten und/oder nicht-modifizierten Antikörper können Tumorzellen erfasst und zerstört werden, die am Endothel angeheftet waren. Ferner erlaubt dieses Verfahren auch die Zerstörung eventuell nicht operabler soliden Tumoranteile oder des gesamten soliden Tumors, wie auch bereits gebildeter Metastasen. Nach operativen Eingriffen können Antikörpergaben über einen entsprechenden Zeitraum vorbeugend gegeben werden, um die Neuansiedelung zirkulierender transformierter Zellen bzw. die Entstehung von Metastasen zu verhindern. Eine Verabreichung kann auch zusammen mit anderen üblichen Arzneimitteln zur Tumorbehandlung wie Cytostatika oder ähnlichen und begleitenden therapeutischen Maßnahmen, Bestrahlungen usw. erfolgen.

Für diagnostische Zwecke können diese Antikörper an radioaktive oder nicht-radioaktive Marker gekoppelt werden und in vivo und in vitro der Suche und

Markierung von Tumorzellen dienen. Die hohe Selektivität und Bindungsaffinität der Antikörper erlaubt auf einfache Weise die Anzahl transformierter Zellen im Blutstrom eines Patienten in einem *in vitro*-Testsystem quantitativ und qualitativ zu bestimmen. Dank der Empfindlichkeit eines solchen Tests, mit dem in einer Probe bereits wenige transformierte Zellen nachgewiesen werden können, muß dem Patienten nur wenig Blut entnommen werden, und durch die ständige Verfügbarkeit der Antikörper kann der Test regelmäßig über einen längeren Zeitraum zur Diagnose durchgeführt werden.

Wesentlich ist, daß die nach diesem Verfahren gewonnenen Produkte, wie z. B. die Kultur der transformierten Zellen, die Hybridomakultur und die monoklonalen Antikörper, hochspezifisch für den betreffenden Organismus sind. Dies bedeutet insbesondere für die monoklonalen Antikörper, daß sie sich von solchen aus einem anderen Organismus, z. B. aus einem anderen Patienten mit derselben Tumorerkrankung, mehr oder weniger stark hinsichtlich ihrer Struktur wie auch ihrer Antigenerkennung unterscheiden. Hierdurch wird es möglich, innerhalb eines relativ kurzen Zeitraums und mit vertretbarem Aufwand für einen bestimmten Patienten, z. B. durch die Verwendung der individual-spezifischen Antikörper, ein speziell für ihn zugeschnittenes Arzneimittel oder Diagnostikum herzustellen.

Dies bedeutet jedoch andererseits nicht, daß die Verwendung monoklonaler Antikörper, die aus und für ein bestimmtes Individuum hergestellt wurden, für andere Individuen prinzipiell ausgeschlossen wäre. Es ist bekannt, daß humane monoklonale Antikörper innerhalb der gleichen Spezies verträglicher sind als Chimären oder gar tierische Antikörper. Werden die Antikörper zur *in vitro*-Diagnose eingesetzt, spielt die Verträglichkeit sowieso keine Rolle. Man wird daher bei einem Patienten, bei dem der Verdacht auf eine bestimmte Tumorerkrankung besteht oder eine solche bereits diagnostiziert wurde, zunächst versuchsweise bereits aus einem anderen Patienten gewonnene Antikörper einsetzen. Sprechen diese in gewünschter Weise an und werden sie gut vertragen, ist es nicht mehr notwendig, für diesen Patienten ebenfalls, wie oben beschrieben, eigene Antikörper herzustellen.

Die nach dem erfundungsgemäßen Verfahren bereitgestellten transformierten Zellen können somit ihrerseits für die Herstellung eines Mittels eingesetzt werden, das zur Diagnose und/oder Therapie einer bestimmten Krebserkrankung bei einer Vielzahl von Individuen einer bestimmten Säugerspezies eingesetzt werden kann.

Hierzu können verschiedene Hybridomazelllinien von einem oder mehreren Patienten mit demselben Tumor etabliert und nach solchen monoklonalen Antikörpern selektiert werden, die spezifische antigene Determinanten auf den Krebszellen unterscheiden. Auf diese Weise läßt sich auch feststellen, ob auf transformierten Zellen, welche aus verschiedenen Patienten mit der gleichen Tumorerkrankung isoliert wurden, identische Determinanten vorkommen. Diese Antikörper können dann zur Diagnose auch bei anderen Patienten verwendet werden, ohne daß bei ihnen zuerst eine *in vitro*-Immunisierung durchgeführt werden muß.

Die Antikörper können in modifizierter und nicht-modifizierter Form nach üblichen Methoden, wie oben beschrieben, in pharmazeutische Zusammensetzungen formuliert werden.

Das Verfahren ist auch geeignet, bei Krebsverdacht im Routinebetrieb auf das Vorhandensein von transfor-

mierten Zellen hin zu untersuchen oder beim Vorhandensein eines röntgenologisch erkennbaren soliden Organumors festzustellen, ob der Tumor bereits maligne Zellen in den Kreislauf gestreut hat oder nicht. Ferner kann bei zweifelhaftem Befund (maligne oder nicht-maligne) auf das Vorhandensein peripher zirkulierender transformierter Zellen hin untersucht werden. Für diesen Zweck werden die Antikörper bzw. ihre hierfür speziell geeigneten Derivate in einem Diagnose-Kit, vorzugsweise für einen ELISA, bereitgestellt.

Das vorstehende Verfahren ist nicht nur im humanmedizinischen Bereich am Menschen, sondern auch an Säugern allgemein in der Tiermedizin und verwandten wissenschaftlichen Disziplinen anwendbar. Die beispielhafte Bezugnahme auf einen Patienten als Vertreter für einen lebendes Individuum in der Beschreibung soll daher nicht beschränkend ausgelegt werden.

Es ist möglich, auf ungefährliche Weise ohne Zusatz von Chemikalien oder sonstigen Hilfsmitteln aus einem lebenden Organismus von Mensch und Tier transformierte Zellen für diagnostische und therapeutische Zwecke zu gewinnen. Das Verfahren erlaubt die Entnahme einer großen Zahl im Kreislauf zirkulierender Tumorzellen. Damit wird die Tumorlast, die üblicherweise zur Metastasierung beiträgt, reduziert.

Das erfundungsgemäße Verfahren bietet insbesondere die folgenden Vorteile:

- Die Gewinnung der transformierten Zellen ist für den Organismus äußerst schonend durchführbar, d. h. es kommt zu keiner vermehrten Freisetzung solcher Zellen in den Blutstrom.
- Die kontinuierliche Arbeitsweise des Isolierungsverfahrens erlaubt die Anzahl der peripheren transformierten Zellen im Blutstrom sehr stark abzusenken, und verringert somit das Risiko einer Metastasenbildung, z. B. nach operativer Entfernung des Primärtumors.
- Die optimale Abstimmung der einzelnen Verfahrensschritte ermöglicht die Erzeugung der Antikörper in relativ kurzer Zeit und unter niedrigen Kosten.
- Die gewonnenen Antikörper sind individual-spezifisch, d. h. sie stellen für den betreffenden Organismus keine Fremdkörper dar. Es kommt weder zu Unverträglichkeitsreaktion, noch werden die Antikörper im Gegensatz zu anderen Fremdproteinen übermäßig rasch abgebaut, wodurch ihre Effizienz wesentlich erhöht wird.
- Die Antikörper sind tumor-spezifisch, d. h. sie erkennen nur die spezifischen Antigene des speziellen Tumors aus dem betreffenden Individuum, die Antigene nicht-transformierter Zellen werden nicht erkannt.
- Die an die Antikörper gekoppelten pharmazeutischen Wirkstoffe entfalten ihre Aktivität nicht unspezifisch über den Organismus verteilt, sondern im wesentlichen nur am gewünschten Wirkort (cell-targeting); unerwünschte Nebenwirkungen werden somit weitgehend vermieden.
- Das aus den Antikörpern hergestellte Arzneimittel kann nicht nur gegen im Blutstrom zirkulierende transformierte Zellen, sondern auch zur Bekämpfung des Primärtumors und eventuell bereits gebildeter Metastasen eingesetzt werden.
- Das aus den Antikörpern hergestellte Arzneimittel wird aus körpereigenen Ressourcen gewonnen, das Risiko von Fremdinfectionen, z. B. durch

Hepatitis oder AIDS, ist ausgeschlossen.

— Die Gewinnung der für den individuellen Patienten tumorspezifischen Antikörper gelingt mit einem vertretbaren Aufwand, s. daß diese nicht nur zur Herstellung patientenspezifischer Arzneimittel, sondern auch für Früherkennung, Diagnostik oder Nachbehandlung nach operativen Eingriffen einsetzbar sind.

— Die Verwendung der aus einem individuellen Organismus gewonnenen Antikörper für andere Organismen als den "Erzeugerorganismus" ist möglich.

Die folgenden Beispiele dienen der Illustration des erfundungsgemäßen Verfahrens.

15

Material und Methoden

1. Benötigte Geräte

1.1. Zellkultur:

sterile Werkbank, CO₂-Inkubator, Wärmeschrank, Wärmeplatte, Fluoreszenzmikroskop, Phasenkontrastmikroskop, Zentrifuge für variable Rotoren, Kühlschränke (4, -20, -80°C), flüssiger Stickstoff, Autoklav

20

1.2. ELISA:

Microplattenphotometer, Pipette, 8-Kanal

1.3. Reinigung der monoklonalen Antikörper:
FPLC, HPLC

1.4. Biochemische Analyse:

IEF-Gerät, Midget System, Elektroblot, 2dim. Gelelektrophorese, Transformator

30

1.5. Kontinuierliche Zentrifuge (Apherese):
UVAR-Zentrifuge von Therakos Inc., Fassungsvermögen 120 ml, mit Bypass

35

2. Reagentien

2.1. Gewebekultur:

Medium RPMI 1640, fötales Kälberserum, L-Glutamin Na-Pyruvat, Phosphatpufferlösung (PBS), pH 7,0, 20 mM, HAT-Medium

40

2.2. Monoklonale Antikörper:

Anti-CD 8, Anti-CD 25, Anti-IL-2, Anti-IFN gamma Rekombinantes IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IFN gamma Macrophagen-Inhibierendes-Peptid (Thr-Lys-Pro, Tuftsin-Fragment 1-3),

45

2.3. Zellfusion:

50% Polyethylenglycol 1500 in HEPES-Puffer, 75 mM, (50% Gew/Vol).

3. Verfahren

3.1. Isolierung und Vermehrung von Krebszellen mit Hilfe der Apherese:

Unter Verwendung einer mit einem Bypass versehenen UVAR-Zentrifuge wurden bei drei Patienten mit unterschiedlichen Tumortypen (Prostatakarzinom, Adenokarzinom der Niere, Adenokarzinom des Kolons) nach dem vorstehend beschriebenen Verfahren ein Buffy-coat aus jeweils 120 ml Blut gewonnen.

50

Bei den Patienten war durch vorherige Operation das histologische Stadium bekannt. Zwei der Patienten (der Patient mit Prostatakarzinom und der Patient mit Adenokarzinom der Niere) wiesen aufgrund derzeit bekannter bildgebender Verfahren noch keine Anzeichen von Fernmetastasen im Gewebe auf. Beim

60

dritten, dem an Adenokarzinom erkrankten Patienten, hatte man bereits multiple Lungenmetastasen und eine Metastase im Bereich der

65

Nebenniere diagnostiziert.

$2.4 \cdot 10^9$ weiße Blutzellen aus dem Buffy-coat werden in ein Röhrchen mit Zellkulturmedium (RPMI 1640) aufgenommen und wie folgt untersucht.

Die Zellen wurden über Nacht unter Standardbedingungen (37°C, 5% CO₂, 95% Luftfeuchtigkeit) kultiviert. Als Medium wurde RPMI 1640 mit 10% fötalem Kälberserum unter Zusatz von B- und T-zellspezifischen Antikörpern (CD 8-, CD 25-, IL-2- und IFN gamma-spezifische Antikörper) und Zugabe von Macrophagen-Inhibierendem-Peptid in den folgenden Konzentrationen verwendet:

Anti-IFN: 100 µg/500 ml Medium

Anti-CD 25: 100 µg/500 ml Medium

Anti-CD 8: 1 mg/500 ml Medium

Macrophag.-Inhib.-Peptid (MIP): 50 mg/500 ml Medium.

Der Ansatz wurde auf Microtiterplatten mit je 200 000 Zellen in 100 µl pro Well verteilt. Am vierten Tag nach Inokulation wurden die Zellen mit je 100 µl Medium (ohne Antikörper und MIP-Zusatz) gefüttert. Während der gesamten Kulturzeit wurde ständig mit 5% CO₂ bei 37°C begast. Die Krebszellen waren nach Teilung als Klone bereits nach vier Tagen im Phasenkontrastmikroskop gut sichtbar.

Zur Kontrolle wurde derselbe Ansatz in Medium ohne Zusatz von Antikörpern und Macrophagen-Inhibierendem-Peptid ausplattiert, wobei die Krebszellen erst nach drei Wochen im Phasenkontrastmikroskop als Klone erkennbar waren. Ein Klon des Ansatzes mit zugegebenen Antikörpern und Macrophagen-Inhibierendem-Peptid wurde entnommen und vermehrt, bis eine Zellzahl von 10^8 erreicht war. Weitere Klone wurden vermehrt und eingefroren.

3.2. Immunisierung:

Die weißen Blutzellen mußten dazu veranlaßt werden, Antikörper gegen krebszellspezifische Antigene zu sezernieren. Hierzu wurden bei einem der Photophoreszyklen 10^9 weiße Blutzellen entnommen, mit 10^8 Krebszellen vereinigt und 4 Tage in 100 ml humanem heparinisiertem Plasma in Rollerkultur bei 37°C, 5% CO₂ inkubiert. Durch Zugabe von IL-2, IL-4, IL-5, IL-6 und IFN gamma wurde die Reifung zu antikörperbildenden Zellen stimuliert. Die Konzentrationen betrugen jeweils 100 µg pro 100 ml Immunisierungsansatz.

3.3. Zellfusion:

Die B-Lymphozyten wurden mit Hilfe eines FACS von den übrigen Zellen abgetrennt. Einige Tage vor der Fusion wurden die menschlichen Myelomazellen (U266) in einer Zeldichte von $3 \cdot 10^5$ Zellen/ml in der logarithmischen Wachstumsphase gehalten. Die Myelomazellen wurden gleichzeitig mit den B-Lymphozyten geerntet und dreimal in PBS gewaschen. Es wurden vier Fusionsansätze vorbereitet, wobei jeweils $5 \cdot 10^7$ Myelomazellen mit $5 \cdot 10^7$ B-Lymphozyten zusammen zentrifugiert und anschließend mit jeweils 1 ml 50% Polyethylenglycol in HEPES fusioniert wurden. Hierauf

folgte die langsame Zugabe von 10 ml RPMI 1640. Der Fusionsansatz wurde in RPMI 1640 gewaschen, 2 Minuten bei 200·g bei RT zentrifugiert, in jeweils 50 ml HAT-Medium aufgenommen und zu jeweils 0,1 ml pro Well in 96-Well-Microtiterplatten ausgesät. Als Feederzellen wurden humane Macrophagen in einer Anzahl von 10^4 pro Well eingesetzt.

3.4. Screening:

Der Kulturüberstand der Hybridomazellen wurde mit einem ELISA auf Antikörper getestet. Hierfür wurde ein Zell-ELISA etabliert. Krebszellen wurden mit geeigneten Methoden an die Plastikoberfläche der Microtiterplatten beschichtet, eventuell daran bindende Antikörper über einen zweiten Antikörper detektiert.

ELISA:

Im ersten Screening nach der Fusion wurde nach Klonen gesucht, die Immunglobulin sezernieren.

1. Inkubation von Kulturüberstand in Microtiterplatten zu je 100 µl pro Well über Nacht bei 4°C
2. Dreimal waschen mit PBS
3. Absättigen mit Albumin oder Blotto, 2 h, 3°C
4. 3× waschen mit PBS
5. Inkubation mit spezifischen Antikörpern gegen humanes Immunglobulin, 2 h bei 37°C
6. Inkubation mit einem enzymkonjugierten zweiten Antikörper (Peroxidase oder alkalische Phosphatase) 1 h bei 37°C
7. Entwickeln durch Zugabe von Substrat und Messung im Ablesegerät

Die positiven Klone werden nun auf krebszell-spezifische Antikörper getestet. Hierzu wurde ein Zell-ELISA etabliert:

1. Herstellung einer Poly-L-Lysinlösung von 1 mg/ml in dest. Wasser
2. Inkubation der Microtiterplatten mit Poly-L-Lysin für 15 Minuten
3. Waschen mit Wasser. Lagerung bei RT nach Trocknung
4. Zweimal waschen der Zellen in Suspension in PBS, Zentrifugation bei 400·g
5. Resuspendieren des Zellpellets in PBS zu 10^5 Zellen pro ml. Einfüllen in die Microtiterplatten, Inkubation 10 min bei RT

Fixierung:

Jeweils 200 µl eines Aceton/Methanolgemisches (50/50 Vol.-%) wurden in die Wells der Microtiterplatten eingefüllt und 2 Min. bei RT inkubiert. Anschließend wurde einmal mit PBS gewaschen.

Die weiteren Schritte wurden wie beim ersten Screening ausgeführt.

3.5. Biochemische Analyse:

Monoklonale Antikörper wurden direkt aus dem Kulturüberstand analysiert. Die Subklassen der leichten und der schweren Kette wurden mit Hilfe eines Subklassentestkits im ELISA bestimmt. Mit Hilfe der isoelektrischen Fokussierung konnte die Monoklonalität der Antikörper sichergestellt werden (Hoffmann et al., Human Genetics, Springer Verlag, 1990, 84, 137–146).

3.6. Epitopscreening:

Es wurden Krebszellen kultiviert, 10^7 Zellen wurden entnommen, dreimal mit PBS gewaschen und in zwei Fraktionen aufgeteilt. Eine Fraktion wurde homogenisiert und in der native Gelelektrophorese (pH 8,8, 9% Acrylamid im Trenngel und 3% Acrylamid im Sammelgel) analysiert, die andere wurde denaturiert (Harnstoff, SDS) und mit der eindimensionalen und zweidimensionalen Gelelektrophorese (Walddinger et al., Electrophoresis, 1986) aufgetrennt. Nach anschließendem Westernblot wurde mit dem Kulturüberstand detektiert. Die erkannte Bande bzw. der erkannte Spot wurde extrahiert und ansequenziert und so das tumorspezifische Antigen identifiziert. Als Kontrolle wurden Proben anderer Gewebe und weiße Blutzellen verwendet (E Harlowe, D. Lane Antibodies, A Laboratory Manual Cold Spring Harbor Laboratory, 1988; D. Baron, U. Hartlaub, Humane monoklonale Antikörper, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, New York 1987).

4. Ergebnisse

In allen drei Fällen (Prostatakarzinom, Adenokarzinom der Niere und Adenokarzinom des Kolons) waren bereits nach vier Tagen in ca. 30% der Wells der Zellkulturplatten Klone transformierter Zellen im Phasenkontrast sichtbar.

Als Kontrolle dient der Buffy-coat eines Patienten mit einer nicht-malignen Erkrankung (autoimmune Regulationsstörung der Lymphozyten), bei dem die weißen Blutkörperchen aus anderen Gründen außerhalb des Körpers behandelt werden mußten. In diesem Falle wurden keinerlei Zellteilungen festgestellt.

Patentansprüche

1. Verfahren zur Isolierung und Kultivierung von im Blutstrom eines Individuums zirkulierenden transformierten Zellen, dadurch gekennzeichnet, daß man durch Zentrifugation von Blut mittels einer zur Abtrennung von Lymphozyten geeigneten, kontinuierlichen Zentrifuge einen Buffy-coat, der die transformierten Zellen, Leukozyten und Lymphozyten enthält, über einer der Zentrifuge nachgeschalteten Bypass entnimmt und den Buffy-coat unter Vermehrung der transformierten Zellen kultiert.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß man einem Individuum Blut entnimmt, dieses zur Gewinnung des Buffy-coats durch die kontinuierliche Zentrifuge leitet und die übrigen Blutbestandteile dem Individuum wieder zurückgibt.
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß man für die Gewinnung des Buffy-coats 100 bis 150 ml Blut verwendet.
4. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß man bei der Kultur des Buffy-coats zur Vermehrung der transformierten Zellen das Wachstum und/oder die Funktion der Lymphozyten und Leukozyten inhibiert.
5. Verfahren nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß man zur Inhibition Macrophagen-Inhibierendes-Peptid, B-zellspezifische und/oder T-zellspezifische Antikörper zugibt.

6. Verfahren nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß man die Leukozyten und Lymphozyten aus dem Buffy-coat durch ein Zellsortingverfahren abtrennt.

7. Verfahren nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß man transformierte Zellen ausgewählt aus Prostatakarzinom-, Adenokarzinom- der Niere und Adenkarzinomzellen des Kolons isoliert und kultiviert.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65